

Cel projektu – Procesy krwiotwórcze podlegają ścisłej regulacji poprzez szereg zidentyfikowanych peptydów o charakterze czynników wzrostu, cytokin, chemokin oraz wybranych bioaktywnych fosfospingolipidów. W ostatnim czasie pojawiły się dowody na udział sygnałowania purynergicznego, które jest pierwotną formą sygnalizacji zewnątrzkomórkowej, w regulacji hematopoezy. Najważniejszym mediatorem sygnałowania purynergicznego jest wydzielany z komórek adenozynotrifosforan (ATP), który jako zewnątrzkomórkowy adenozynotrójfosforan (**eATP**) wiąże się do rodziny receptorów jonotropowych typu P2X. Do tej pory zidentyfikowano 7 członków rodziny P2X (P2X1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7), które są aktywowane wyłącznie przez eATP, przy czym na prawidłowych mysich oraz ludzkich krwiotwórczych komórkach macierzystych (**HSPC**) wysokiej ekspresji ulegają receptory **P2X1**, **P2X4** oraz **P2X7**. eATP aktywuje również receptory z rodziny P2Y, ale receptory te, w przeciwieństwie do receptorów P2X, są aktywowane nie tylko wyłącznie przez eATP, ale również przez np. eADP, eUTP i eUDP, a ich rola w regulacji migracji HSPC nie jest znacząca. Stąd w proponowanych badaniach skupimy się na roli receptorów P2X w procesach krwiotworzenia. Ponadto, eATP jest przetwarzany w przestrzeni zewnątrzkomórkowej przez dwie ektonukleotydazy błony komórkowej - CD39 oraz CD73 do zewnątrzkomórkowego metabolitu, adenozyne (**eAdo**). eAdo aktywuje receptory purynergiczne typu P1. Rodzina P1 składa się z czterech podtypów receptorów sprzężonych z białkiem G (A1, A_{2A}, A_{2B} i A3), a mysie i ludzkie HSPC wykazują wysoką ekspresję A_{2A} i A_{2B}. Dlatego w naszych badaniach skupimy się nad określeniem roli receptorów A_{2A} i A_{2B} w biologii HSPCs. **Realizowane badania** – Nasze wstępne dane wskazują, że eATP i eAdo regulują odmiennie biologię HSPC. Ich działanie naśladuje, zgodnie z chińską filozofią, przeciwny efekt „yin-yang”, gdzie eATP jest pozytywnym „yin” a eAdo negatywnym „yang” mediatorem sygnalizacji purynergicznej w procesach hematopoezy. W naszych badaniach podejmiemy próbę określenia mechanizmów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej indukowanej eATP i eAdo w HSPC, prowadzącej do aktywacji wewnątrzkomórkowego receptora rozpoznawania wzorców (ang. pattern recognition receptor) - inflammasomu Nlrp3 (**Nlrp3**). Na poziomie molekularnym, podczas gdy sygnalizacja eATP-P2X prowadzi do uwolnienia w cytozolu reaktywnych form tlenu (ROS) przez błonę komórkową oraz błonę mitochondrialną, sygnałowanie od pobudzonych receptorów eAdo-P1 aktywuje wewnątrzkomórkową oksydazę hemową-1 (**HO-1**). Zweryfikujemy eksperymentalnie hipotezę, iż ROS pełnią rolę aktywatora Nlrp3, a HO-1 działa jako negatywny regulator tego ważnego wewnątrzkomórkowego PRR. Nasze ostatnie badania wykazały, że Nlrp3 odgrywa istotną rolę w regulacji migracji HSPC, prowadzi do aktywacji mikrośrodowiska krwiotwórczego BM dla prawidłowego wszczepiania się oraz ekspansji i różnicowania HSPC podanych w materiale przeszczepowym. Skoncentrujemy się na roli Nlrp3 regulowanego odmiennie przez eATP i eAdo i zrealizujemy 3 powiązane ze sobą cele badawcze dotyczące: (1). *Wyjaśnienia mechanizmów oraz roli sygnalizacji receptorów eATP-P2X w regulacji metabolizmu, migracji, proliferacji oraz różnicowania HSPC. Skoncentrujemy się na biologicznych skutkach interakcji eATP z trzema receptorami typu P2X, które ulegają silnej ekspresji na powierzchni HSPCs - P2X1, P2X4 i P2X7.* (2). *Zbadania roli oddziaływań eAdo-P1 w regulacji biologii HSPC. Badania zostaną przeprowadzone ze szczególnym uwzględnieniem receptorów typu P1 - A_{2A} i A_{2B}. Zweryfikujemy wyniki wstępnych badań świadczące o negatywnym wpływie eAdo na procesy proliferacji, migracji oraz wszczepiania się HSPC, w których również pośredniczy eATP.* (3). *Analiza profilu proteomicznego oraz transkryptomu wyjaśniająca przeciwstawne efekty sygnałowania eATP-P2X i eAdo-P1 w regulacji metabolizmu i ekspansji HSPC.*

Uzasadnienie wyboru tematyki badawczej – Zaproponowane innowacyjne badania dotyczą wyjaśnienia pozytywnej (yin) oraz negatywnej (yang) regulacji HSPCs przy udziale sygnałowania purynergicznego. Hipotezę badawczą zweryfikujemy z wykorzystaniem pierwotnych prawidłowych mysich oraz ludzkich HSPC, dostępnych mysich szczepów pozbawionych receptorów purynergicznym oraz z zastosowaniem drobnocząsteczkowych modulatorów badanych szlaków sygnałowych. Równolegle przeprowadzimy analizy molekularne, celem identyfikacji zmian na poziomie transkryptomu oraz profilu proteomicznego, stosując dostępne metody RNA-Seq oraz MS. Badania te doprowadzą do opracowania lepszej strategii mobilizacji i zasiedlania komórek macierzystych, a także wydajniejszych protokołów ekspansji *ex vivo* HSPC. Wyjaśnimy rolę niedostatecznie zbadanych receptorów purynergicznym P2X i P1, które w ostatnich latach zyskały miano „krytycznych czynników regulujących procesy krwiotworzenia”.